

A DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A *DROSOPHILA* 26S PROTEASZÓMA p54 ALEGYSÉGÉNEK LEHETSÉGES EXTRAPROTEASZÓMÁLIS SZEREPE

KISS PETRA VERONIKA



Témavezető: Udvardy Andor, Ph.D., D.Sc.

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóintézete
Biokémiai Intézet
Intracelluláris fehérjelebontás csoport

SZEGED

2007

Bevezetés

Az ubikvitin-proteaszóma rendszer felelős az intracelluláris fehérjék szabályozott lebontásáért. A rendszer első komponense az ubikvitinációt végző enzimaszkád, mely felismeri a rövid életidejű fehérjékben megtalálható ún. degradációs szignálokat, kovalensen kötött multiubikvitin láncot alakít ki rajtuk, és ezáltal intracelluláris bontásra jelöli ki azokat. A multiubikvitinált fehérjéket a 26S proteaszóma ismeri fel és bontja le, amely a másik fő komponense az ubikvitin-proteaszóma rendszernek. A 26S proteaszóma egy nagy multiprotein komplex, mely egy ATP-függő folyamat során áll össze két alkomplexumból: a katalitikus core partikulumból (CP) és a regulátor partikulumokból (RP). A CP egy nem-specifikus proteáz, nem képes különbséget tenni multiubikvitinált és nem ubikvitinált fehérjék között.

A RP-ok, melyek a CP alapjaihoz kapcsolódnak, biztosítják a 26S proteaszóma szelektivitását a multiubikvitinált szubsztrát-fehérjék irányába; kitekerik a szubsztrátfehérjéket chaperone-szerű aktivitásuk révén, felnyitják a CP csatornáját, lehasítják a szubsztrátfehérjéken lévő ubikvitin egységeket, és betáplálják a bontásra szánt fehérjéket a CP-ba. A RP-kat feloszthatjuk az alap (bázis) és a fedél alkomplexumokra. Az egyik fedél alegység, az Rpn11/p37B, mely egy újszerű Zn^{2+} metalloproteáz domént tartalmaz, felelős a multiubikvitinált szubsztrátfehérjék ubikvitin egységeinek lehasításáért. A Zn^{2+} eltávolítása, illetve az alegység aktív helyének cink-koordinációban résztvevő hisztidin aminosavainak mutációja nemcsak a deubikvitináló aktivitást gátolja meg, hanem az egész proteaszómális degradációs ciklust felfüggeszti.

A másik fontos szerepet betöltő RP alegység, a p54 ubikvitin-kötő alegység, mely képes a multiubikvitinált fehérjéket szelektíven felismerni és megkötni. Noha a p54 ubikvitin receptor alegység és egyéb proteaszóma-kölcsönható fehérjék szerepét a szubsztrát-felismerésben igen széles körben tanulmányozták, a p54 alegységnek e folyamatban betöltött szerepében még számos tisztázásra váró kérdés maradt. A p54 által történő szubsztrát-felismerés kétféleképp mehet végbe. Ha feltételezzük, hogy a p54 a RP felszínén exponált pozícióban helyezkedik el, a szubsztrát-felismerés végbemehet az alegység proteaszómához kötött állapotában. Mivel azonban a p54 az egyetlen proteaszóma alegység, mely RP-kötött és szabad formában is megtalálható a legtöbb élőlényben, egy ingázó ciklust is feltételezhetünk a szubsztrát-kiválasztás során: e szerint, miután a p54 disszociál, a szabad alegység megköti a multiubikvitinált szubsztrát-fehérjét, majd visszakapcsolódik a proteaszómába, ezáltal prezentálja a fehérjét lebontásra.

Célkitűzések

Az a felfedezés, hogy a Zn^{2+} eltávolítása az Rpn11 izopeptidáz doménjéről nemcsak az Rpn11 deubikvitináló aktivitását rontja el, hanem az egész proteasómális degradációs ciklust felfüggeszti, azt sugallta, hogy a szubsztrátfehérjék Zn^{2+} eltávolítás hatására bekövetkező stabilizálódása annak következménye, hogy a 26S proteasóma bizonyos funkciója(i) az RP alegységek Zn^{2+} koordinálta kölcsönhatásai révén valósul(nak) meg.

A kérdés tisztázására komplex strukturális és funkcionális vizsgálatokat terveztünk, hogy megállapítsuk:

- a RP alegységei között működnek-e Zn^{2+} -függő kölcsönhatások,
- ezen kölcsönhatásoknak milyen szerepe van a proteasóma működésében.

Ehhez vizsgálni kívántuk:

- *in vitro* a feleslegben adott Zn^{2+} , illetve a Zn^{2+} elvonásának a *Drosophila* 26S proteasómára gyakorolt hatását,
- *in vivo* a p54 fehérje ciklikus változását, melynek érdekében a teljes hosszúságú p54 fehérjét, illetve különböző darabjait termelő transzgénikus *Drosophila melanogaster* törzsek létrehozását és vizsgálatát terveztük.

Feltételezésünk szerint, ezek a vizsgálatok segítséget nyújtanak majd a p54 ingázó ciklusának tisztázásában, a multiubikvitinált szubsztrát-felismerésben betöltött szerepének megértésében, valamint a p54 extraproteasómális sorsának felderítésében.

Alkalmazott módszerek

Biokémiai módszerek:

Rekombináns DNS technikák:

- a Hsp82 hősokkfehérje megklónozásához és a különböző affinitás címkével jelölt konstrukciók létrehozásához
- a transzgénikus *Drosophila* törzsek P-elem transzformálásához használt vektorok elkészítéséhez

Natív poliakrilamid gélelektroforézis

- a proteaszóma szerkezetének vizsgálatához

Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis

Western blot analízis

Ezüst festés

} - fehérjék azonosítására

Kétdimenziós gélelektroforézis

- a módosított p54 formák elválasztásához

Kémiai keresztkötés

- a proteaszóma alegységek kölcsönhatásainak vizsgálatához

Immunprecipitáció

- a p54 fehérje kölcsönható partnereinek *in vitro* azonosításához

Élesztő két-hibrid vizsgálat

- a p54 fehérje kölcsönható partnereinek *in vivo* azonosításához

Gélszűrési kromatográfia

- annak meghatározásához, hogy a rekombináns p54 fehérje származékok képesek-e beépülni a proteaszómába

Zn²⁺ affinitás kromatográfia

- annak meghatározásához, hogy tartalmaznak-e a különböző proteaszóma alegységek Zn²⁺- kötő helyet

Strep-Tactin affinitás kromatográfia

- a Strep-címkével ellátott p54 származékok tisztítására

Kitin-affinitás kromatográfia

- a kitin-kötő doménnel fúzionált fehérjék tisztítására

Genetikai módszerek:

P-elem transzformáció

- a transzgénünknek *Drosophila* embriókba történő bejuttatására

Transzgén indukció

- a transzgénünk termelődésének előidézésére

Eredmények

I. Feleslegben adott Zn^{2+} a 26S proteaszóma szétszerelődését és az ubikvitin receptor (p54 fehérje) disszociációját indukálja

A feltételezett Zn^{2+} -függő alegység-kölcsönhatások tanulmányozására azt a stratégiát választottuk, hogy megvizsgáltuk az exogén Zn^{2+} -nek a RP alegységek kölcsönhatásaira gyakorolt hatását. Ahhoz, hogy ezt a fajta megközelítést kihasználhassuk, először is be kellett bizonyítanunk, hogy az Rpn11/p37B alegységen kívül vannak más RP alegységek is, melyek Zn^{2+} - kötő helyet tartalmaznak. Ennek meghatározására egy tisztított 26S proteaszóma frakció alegységeit denaturáló körülmények között szétválasztottuk, és Zn^{2+} -kelát affinitás oszlopra vittük. Azt találtuk, hogy számos RP és CP alegység kötődött a fém-kelát oszlophoz, melyek mindegyike 0,2 M imidazol koncentráció körül eluálódott, ami erős Zn^{2+} - kötő hely jelenlétére utal ezen proteaszómális alegységek esetében.

A feltételezett Zn^{2+} -függő RP alegység kölcsönhatásokat bifunkcionális keresztkötőszerekkel történő kémiai keresztkötéssel és natív poliakrilamid gélelektroforézissel szándékoztunk nyomon követni.

Annak céljából, hogy az exogén Zn^{2+} - nek a RP alegység-kapcsolataira gyakorolt hatását teszteljük, tisztított 26S proteaszóma preparátumot 20 percig inkubáltuk növekvő koncentrációban (0- 200 μ M) adott $ZnCl_2$ – dal. Az inkubációs idő letelte után a RP-alegységeket keresztkötöttük diszukcinimidil-szuberát hozzáadásával. A RP alegységek keresztkötési mintázatát különböző RP alegységekre specifikus monoklonális ellenanyagok (mAb) segítségével, immunoblot technikával vizsgálva azt találtuk, hogy a feleslegben adott Zn^{2+} jellegzetes átrendeződéseket idézett elő a fedél alkomplexum alegység-kölcsönhatásaiban. Az ATP-áz gyűrű alegységeinek kölcsönhatásai nem változtak meg, míg a p54 ubikvitin receptor alegység natív proteaszómára jellemző összes kapcsolata megszűnt. Ezek az eredmények azt sugallták, hogy kívülről hozzáadott Zn^{2+} jelenlétében a p54 alegység kilép a RP-ből, mivel a Zn^{2+} hozzáadását követően megszűnt az összes kapcsolata egyéb RP alegységekkel.

Ezt a feltételezést alátámasztandó, részlegesen tisztított 26S proteaszóma preparátumot inkubáltunk 200 μ M Zn^{2+} jelenlétében vagy a nélkül, és elválasztottuk ATP tartalmú natív gélen,

mely 200 μM Zn^{2+} hozzáadásával vagy a nélkül készült. A kontroll minta immunoblot analízise a konvencionális natív poliakrilamid gél mintázatot adta: két 26S proteaszóma sávot, melyek a 26S proteaszóma egy, illetve két regulátor komplexet tartalmazó formáinak felelnek meg, és a szabad CP-ot. Mindkét 26S proteaszóma sáv erős peptidáz aktivitást mutatott a fluorogén peptid gél felülrétegzési kísérletek során. Egészen más mintázatot kaptunk 200 μM Zn^{2+} jelenlétében. A 26S proteaszóma két formáját nem lehetett megfigyelni, a RP és a CP teljes mennyisége szabad partikulumként volt jelen, és a p54 teljes mértékben disszociált a RP-ről. A gél felülrétegzési kísérlet a peptidáz aktivitás elvesztését mutatta Zn^{2+} jelenlétében.

II. A 26S proteaszóma Zn^{2+} -indukált strukturális és funkcionális változásai reverzibilisek

A Zn^{2+} -eltávolítást 200 μM 1,10-fenantrolin hozzáadásával értünk el. Zn^{2+} -eltávolítás hatására a 26S proteaszóma mindkét elektroforetikus variánsa visszaalakult, a p54 alegység visszaépült az újra összeszerelődött proteaszómába, és a 26S proteaszóma visszanyerte peptidáz aktivitását.

III. A p54 kölcsönható fehérjék azonosítása

A p54 Zn^{2+} -indukálta disszociációját, és a szabad alegységnek nem proteaszómális fehérjékkel történő lehetséges kölcsönhatásait bifunkciós keresztkötőszerezellel végzett kísérletekkel vizsgáltuk, a kölcsönható fehérjéket immunprecipitációval tisztítottuk és tömegspektrometriai vizsgálattal azonosítottuk. A proteaszómából disszociált p54 kölcsönható partnerei között a Hsp82 hősokkfehérjét és az Smt3 SUMO-aktiváló enzimet sikerült azonosítanunk.

A p54 fehérje és az Smt3 SUMO-aktiváló enzim kölcsönhatását élesztő két-hibrid kísérlettel is sikerült alátámasztani. Élesztő két-hibrid technikával a p54-nek az Smt3 SUMO-aktiváló enzimmel kialakított kölcsönhatásán kívül a DmUbc9 SUMO-konjugáló enzimmel történő kölcsönhatását is kimutattuk. Mindkét fehérje, valamint a Hsp82 is kölcsönhatott a p54 fehérjével *in vitro* kötési (pull-down) kísérletekben, mely eredmények nagymértékben alátámasztották tömegspektrometriával kapott adatainkat.

IV. A transzgénikus *Drosophila melanogaster* törzsek előállítása és vizsgálata

A p54 ciklikus változásának *in vivo* tanulmányozására transzgénikus *Drosophila melanogaster* törzseket hoztunk létre. A p54 fehérjének két fontos doménje van: a von Willebrand A típusú domén, ami a fehérje N-terminális felén helyezkedik el, és az UIM domének (ubiquitin interaction motif), melyek a fehérje C-terminális felén helyezkednek el. Irodalmi adatok szerint a fehérje N-terminális fele felelős a p54-nek a RP-ba történő beépüléséért, az UIM domének pedig a multiubikvitinált fehérjék megkötéséért. Arra szerettünk volna választ kapni, hogy mi ezen domének hatása *in vivo*, azaz mi történik, ha túltermeltetjük őket *Drosophilában*. Ezért olyan transzgénikus *Drosophila* törzseket hoztunk létre, melyek a p54 fehérje különböző darabjait képesek fejlődés- és/vagy szövetspecifikusan indukálható módon termelni. Azok a *Drosophila* törzsek, melyek a p54 N-terminális felét embrionális kortól kezdve, minden szövetben expresszálták, nem mutattak semmilyen fenotipikus változást, noha a p54 N-terminális fehérje magas szinten termelődött ezekben az állatokban. A p54 N-terminális felét termelő muslicákból gélszűrési kromatográfiával sikerült kimutatni, hogy e fél p54 darab képes beépülni a proteaszómába. Ezzel szemben minden olyan transzgénikus állat, mely a p54 C-terminális felét termelte, legkésőbb az L3 lárvastádiumban elpusztult. Ezen állatok esetén kimutattuk a C-terminális p54 fehérje termelődését, mely embrionális kortól kezdve végig az egyedfejlődés során az N-terminális félhez hasonlóan magas szinten expresszáldott. Ezen mutáns lárvák esetén azt találtuk, hogy a kontroll törzshöz képest kisebb az agyuk és az imágó korongjaik, mely fenotípus gátolt proteaszóma funkcióra utal. A legmeglepőbb fenotípusa azonban ezeknek a lárváknak az előbél kitágulása, mely többek között a gátolt perisztaltika eredménye lehet.

Mivel *in vitro* eredményeink azt mutatták, hogy a proteaszóma RP-ából disszociált p54 kölcsönhat számos nem-proteaszómális fehérjével, melyek közül bizonyosaknak szerepe van a p54 proteaszómába történő visszaépülésében (Hsp82), míg másoknak a p54 esetleges poszttranszlációs módosításában (Smt3 SUMO-aktiváló enzim és DmUbc9 SUMO-konjugáló enzim), ezért további célul tűztük ki, annak megállapítását, hogy a p54-nek milyen szerepe, sorsa van a proteaszómán kívül, ezért megpróbáltuk azonosítani kölcsönható partnereit, és esetleges poszttranszlációs módosításait. Annak érdekében, hogy megtaláljuk és azonosítsuk ezeket a fehérjéket, illetve a poszttranszlációs módosított formákat, létrehoztunk olyan transzgénikus *Drosophila* törzseket is, melyek a p54 különböző formáinak affinitás címkével ellátott változatait

expresszálják. E célra az ún. Strep-címkét választottuk, melynek előnye, hogy egy rövid tag, mely gyors, egy lépésben történő tisztítást tesz lehetővé fiziológiai körülmények között.

Transzgénikus *Drosophila* törzsekkel termeltethető módon, Strep-taggel rendelkező formában a következő p54-származékokat állítottuk elő: a teljes hosszúságú p54-et, annak N-terminális felét és C-terminális felét. Hasonlóan a tag nélküli változatokhoz, a Strep-taggel ellátott N-terminális, valamint a teljes hosszúságú p54-et termelő muslicák életképesek, nem mutatnak fenotipikus változást, míg a Strep-taggel rendelkező C-terminális p54-et termelő törzsek egy része a tag nélküli változathoz hasonlóan késői L3 lárvállapotig, míg 1-2 törzs bábállapotig élt el. Ez a különbség valószínűleg az expresszió szintjének különbségével magyarázható.

Emellett olyan törzseket is létrehoztunk, melyek hőmérséklet-függő módon termelik a Strep-taggel ellátott p54 C-terminális felét.

V. Posztisztetikusan módosított p54 C-terminális formák azonosítása

A Strep-taggel rendelkező törzsek vizsgálata során Strep-affinitás kromatográfiás tisztítást végeztünk a taggel ellátott C-terminális p54 fehérjét expresszáló, illetve a C-terminális p54 fehérjét nem termelő kontroll L3 állapotú lárvákból készült mintákból. Azt találtuk, hogy a C-terminális p54 fehérjét expresszáló törzsek eluátumaiban számos magasabb molekulatömegű p54 származék dúsul fel, melyek a kontroll törzs eluátumaiban nem voltak jelen, és amelyek a p54 C-terminális fehérje posztisztetikusan módosított formáinak jelenlétére utaltak. Úgy gondoljuk, ezen formák jelenléte megmagyarázhatja a túltermelt C-terminális p54 által okozott letalitást, ezért a továbbiakban ezen módosított p54 származékok azonosítására összpontosítottunk. A Strep-taggel ellátott p54 C-terminális fehérjét termelő törzsekkel végzett Strep-affinitás kromatográfia eluátumait kétdimenziós gélelektroforézissel elválasztottuk, mivel az első dimenzióban alkalmazott, a C-terminális p54 fehérje és módosított formáinak extrém savas izoelektromos pontját kihasználó izoelektromos fókuszálási lépés, majd az ezt követő SDS-PAGE megfelelő elválasztást és tisztaságot eredményezett a tömegspektrometriai vizsgálatokhoz. Ezen kívül a p54 fehérje módosított formáit *in vitro* is kialakítottuk. Ehhez a p54 fehérje C-terminális felének kitin-kötő doménnel fuzionált formáját használtuk, melyet *E. coli*-ban

termeltettünk, kitin gyöngyökön immobilizáltunk, és *Drosophila* embriókból készült kivonattal inkubáltunk ATP jelenlétében.

MALDI-TOF tömegspektrometriával mind az *in vivo*, mind az *in vitro* mintákból sikerült kimutatni, hogy a posztisztetikusán módosított formák a p54 fehérje ubikvitinált formáinak felelnek meg.

Összefoglalás

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy:

1. A feleslegben adott Zn^{2+} a 26S proteaszóma szétszerelődését és az ubikvitin receptor (p54 fehérje) disszociációját indukálja, valamint a 26S proteaszóma peptidáz aktivitásának elvesztéséhez vezet.
2. Kimutattuk, hogy 26S proteaszóma Zn^{2+} -indukált strukturális és funkcionális változásai reverzibilisek.
3. Azonosítottuk a proteaszómából disszociált p54 kölcsönható partnereit.
4. A p54 alegység ciklikus változásának tanulmányozására transzgénikus *Drosophila melanogaster* törzseket állítottunk elő és vizsgálatuk során megállapítottuk:
 - a teljes hosszúságú p54 fehérje és N-terminális felének túltermelése nem okoz fenotipikus változást
 - a p54 fehérje C-terminális felének túltermelése L3/bábállapotban bekövetkező letalitást okoz
 - a p54 N-terminális fele és a teljes hosszúságú p54 fehérje képes beépülni a proteaszómába, míg a C-terminális p54 nem
 - a p54 C-terminális felét expresszáló törzsek eluátumaiban számos magasabb molekulatömegű p54 származék dúsul fel
 - a p54 C-terminális felének posztszintetikusan módosított formái ubikvitinált formáknak felelnek meg.

Közlemények

1. **Kiss P**, Szabó Á, Hunyadi-Gulyás É, Medzihradszky KF, Lipinszki Z, Pál M, Udvardy A (2005) *Zn²⁺-induced reversible dissociation of subunit Rpn10/p54 of the Drosophila 26 S proteasome*. Biochemical Journal; 391(Pt 2):301-10. IF: 4,224
2. Szabó Á, Pál M, Deák P, **Kiss P**, Újfaludi Zs, Pankotai T, Lipinszki Z and Udvardy A (2007) *Molecular characterization of the Rpt1/p48B ATPase subunit of the Drosophila melanogaster 26S proteasome*. Molecular Genetics and Genomics; 278(1):17-29. IF:2,632